

THESIS

MUNICH

1966

4

**Untersuchungen
über die enzymatische Bestimmung von
3 α , 3 β - und 17 β - Hydroxysteroiden mit
Hydroxysteroiddehydrogenasen
aus *Pseudomonas Testosteroni***

Leonore Enzler

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. Schwiegk

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ENZYMATISCHE BESTIMMUNG
VON 3α - , 3β - UND 17β - HYDROXYSTEROIDEN
MIT HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASEN AUS PSEUDOMONAS TESTOSTERONI

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Leonore Enzler
aus Augsburg

München 1966

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. J. Karl
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Schwegk
Dekan: Prof. Dr. M. Kiese
Tag der mündlichen Prüfung: 8.11.1966

MEINEN ELTERN GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

- I Einleitung
- II Problemstellung
- III Material und Methoden
 - 1. Darstellung des Enzymgemisches
 - 2. Die quantitative Bestimmung von Steroiden
 - a) Reaktionsprinzip
 - b) Ausführung der Bestimmung
 - c) Berechnung der umgesetzten Steroidmenge
 - 3. Hemmung der α - Aktivität
- IV Experimentelle Ergebnisse
 - A. Voruntersuchungen zum Verhalten des Enzyms und zum Reaktionsablauf
 - 1. Enzymstabilität
 - 2. Enzymaktivität
 - 3. Einfluß des pH auf das Reaktionsgleichgewicht
 - B. Bestimmung von Steroiden
 - 1. Bestimmung von Steroiden als Reinsubstanzen
 - a) Bestimmung von 3α - Hydroxysteroiden
 - b) Bestimmung von 3β - und 17β - Hydroxysteroiden
 - 2. Die Hemmung der α - Aktivität
 - 3. Die Messung des Gehaltes an 3α - und 3β -, 17β - Steroiden im Urinextrakt nach Zimmermann
 - 4. Bestimmung von Pregnantriol aus dem Urin
 - 5. Bestimmung von chromatographisch getrennten Steroiden aus dem Urin
- V Diskussion der Versuchsergebnisse
 - 1. Zur Enzymstabilität
 - 2. Vergleich der Eigenschaften des Enzymgemisches mit den isolierten α - und β - Enzymen.
 - 3. Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Steroide.
 - 4. Versagen der Methode
 - 5. Die Richtigkeit der Messungen bei der Steroidbestimmung
 - 6. Zur praktischen Anwendbarkeit der Bestimmungsmethode

VI Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

VII Literaturverzeichnis

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ENZYMATISCHE BESTIMMUNG VON 3α -,
 3β - UND 17β - HYDROXYSTEROIDEN MIT HYDROXYSTEROIDDEHYDROGE-
NASEN AUS PSEUDOMONAS TESTOSTERONI

I. EINLEITUNG

Bei der Untersuchung von Synthese und Umbau der Steroidhormone wurden eine Reihe von Enzymen isoliert, von denen jedes eine bestimmte Reaktion katalysiert. Alle diese Enzyme sind substrat- und stereospezifisch und konnten daher auch zur Strukturaufklärung von Steroiden verwendet werden. Aus zahlreichen Organen von Säugetieren und vom Menschen wurden aus Leber, Niere, Nebenniere, Placenta und Erythrocyten "Steroidenzyme" rein dargestellt. Besonders zahlreich sind sie offenbar in der Leber, wo sich wesentliche Vorgänge von Aufbau und biologischer Inaktivierung von Steroiden abspielen. Als Beispiele für einige der bisher isolierten Enzyme seien genannt: eine 3α - Hydroxysteroiddehydrogenase in Leber, Niere und Erythrocyten der Ratte, bei Meerschweinchen eine 3β - Hydroxydsteroiddehydrogenase, in Rattenleber und menschlicher Placenta eine 17β - Dehydrogenase, die spezifisch Östradiol in Östron umsetzt. In der menschlichen Leber konnten 3α - Hydroxysteroiddehydrogenasen nachgewiesen werden.

Nicht nur bei Lebewesen, die physiologischerweise Steroidhormone umzusetzen vermögen, wurden entsprechende Enzyme gefunden. Auch einige Mikroorganismen sind in der Lage, "Steroidenzyme" zu bilden, wenn ihnen im Nährmedium Steroid als einziger Kohlenstofflieferant angeboten wird. Manche Hefen ⁽¹⁶⁾ und Streptomycesarten ⁽¹⁷⁾ oxydieren unter dieser Voraussetzung Östradiol und Östron. Aus Streptomyces hydrogenans isolierte HÜBENER ^(13,20) eine 20β - Hydroxysteroiddehydrogenase, die zur mikrochemischen Identifizierung und Trennung von Steroiden dient. Obwohl die Enzyme aus Mikroorganismen die gleichen Reaktionen

wie die tierischen Dehydrogenasen katalysieren, stellen sie im Vergleich zu diesen in ihrem Aufbau nur "einfache Modelle" dar.

Für den quantitativen Nachweis von Steroiden hat das Bodenbakterium *Pseudomonas testosteroni* besondere Bedeutung erlangt. *Pseudomonas testosteroni* vermag Testosteron als einzige Kohlenstoff"quelle" zu verwenden. Sind Steroide, z.B. Testosteron, im Nährboden der Bakterienkultur anwesend, so bildet *Pseudomonas* zwei spezifische, an Nikotinamidadenindinukleotid gebundene Enzyme, die den Abbau von Testosteron zu CO_2 und H_2O katalysieren (1,19).

1952 isolierten TALALAY, DOBSON und TAPLEY (5,19) diese beiden Enzyme. In vitro bewirken sie die reversible Umwandlung von Steroidalkoholen mit α -gruppiertter Hydroxylgruppe am C-Atom 3 und mit Hydroxylgruppen in β -Konfiguration am C-Atom 3 und 17 in die entsprechenden Ketone. 1953 wurden diese beiden Enzyme in die Steroidchemie eingeführt (5), da deren Isolierung und Substratspezifität für analytische Zwecke sich geeignet erwiesen (1,2).

II. PROBLEMSTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit soll mit 3α - und 3β -, 17β - Hydroxysteroiddehydrogenase aus *Pseudomonas testosteroni* der quantitative Ablauf der Oxydation verschiedener Nebennierenrindensteroide mit Hydroxylgruppen in α -Stellung am C-Atom 3 und mit β -gruppierten Hydroxylgruppen am C-Atom 3 und 17 untersucht und mit vorliegenden Ergebnissen verglichen werden.

Voraussetzung dazu war die Darstellung der Enzyme aus *Pseudomonas testosteroni*. Die Isolierung erfolgte auf einfach auszuführende Art nach vorliegenden Angaben (4). Gewonnen wurde ein Enzymgemisch: α -Hydroxysteroiddehydrogenase = α -Enzym und β -Hydroxysteroiddehydrogenase = β -Enzym. Um die beiden Aktivitäten der verschiedenen Enzyme zu trennen, wurde das α -Enzym

spezifisch mit Parahydroxymercuribenzoat = PHMB gehemmt.

Zur quantitativen Bestimmung von Steroiden wurden zunächst reine Nebennierenrindensteroiden verwendet, um den Reaktionsablauf und die Fehlerbreite der Methode zu untersuchen. Danach sollten Steroide bestimmt werden, die durch Extraktion, bzw. Chromatographie aus dem Harn isoliert wurden.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Darstellung des Enzymgemisches

Material:

Tris-hydroxymethyl-aminomethan = Tris-Puffer

Tris - Puffer 0,2 M pH 7,5

Tris - Puffer 0,2 M pH 9,5

Aceton (p.a. Fa. Merck, Darmstadt)

Pseudomonas testosteroni - Pulver (Worthington Biochemical Corp.)

Methode der Enzymdarstellung:

Die Darstellung des Enzymgemisches erfolgte nach den Angaben von STEMPFEL und SIDBURY ⁽⁴⁾. Entsprechend der Vorschrift dieser Autoren wurden sämtliche Arbeitsgänge bei 4°C (Kälteraum) ausgeführt.

1 g getrocknetes Pseudomonas testosteroni wurde in 10 ml 0,2 M Trispuffer (pH 7,5) suspendiert und bei 4°C eine Stunde lang zum Aufquellen stehen gelassen. Hierauf erfolgte die Ausfällung mit 50 ml Aceton, das auf -16°C vorgekühlt war. Der Niederschlag wurde mit einem Buchnerfilter abfiltriert und zweimal mit kaltem Aceton nachgewaschen. Nun wurde das Präzipitat in 10 ml Trispuffer (pH 9,5) aufgeschwemmt und für 20 Minuten stehengelassen. In der Kältezentrifuge bei 0°C und einer Be-

schleunigung von 10 000 g erfolgte die Abtrennung der korpuskulären Bestandteile. Die Zentrifugierdauer betrug 30 Minuten. Nach sorgfältigem Dekantieren des Überstandes wurde der Bodensatz nochmals in 10 ml Trispuffer suspendiert, für 20 Minuten stehengelassen und erneut wie oben angegeben zentrifugiert. Die beiden Überstände waren klar und hellgelb gefärbt. Sie stellen ein Gemisch von α - und β -Hydroxysteroiddehydrogenase (HSDH) dar.

2. Bestimmungsmethode

Material:

Na - Pyrophosphat	0,1 M	pH 9,5
Hydrazinhydrat	1,0 M	pH 9,5
Diphosphopyridinnukleotid (DPN^+) = Nikotinamidadeninukleotid (NAD^+)		
(Fa. Boehringer Mannheim)	0,005 M	
Methanol (p.a. Fa. Merck Darmstadt)		
Reine Steroidhormone: Pregnantriol (5β -Pregnan- 3α , 17α , 20α -triol)		
Androsteron (3α -Hydroxy- 5α -androstan- 17α -on)		
Tetrahydrocortison THE (3α , 17α , 21 -Trihydroxy- 5β -Pregnan- 11 , 20 -dion)		
Dehydroepiandrosteron DEA (3β -Hydroxyandrost- 5 -en- 17α -on)		
Aetiocholanolon (17β -Hydroxy- 5β -androstan- 3α -on)		
Cortol (5β -Pregnan- 3α - 11β - 17α - 20α - 21 -Pentol)		
β - Cortol (5β -Pregnan- 3α - 11β - 17α - 20β - 21 -Pentol)		
Pregnandiol (5β -Pregnan- 3α , 20α - diol)		
(Fa. Schering, Berlin)		

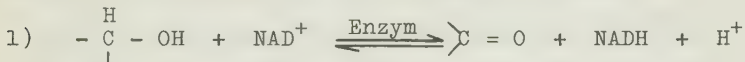
Enzympräparation

Die NAD^+ -Lösung wurde jede Woche frisch zubereitet und gefroren aufbewahrt.

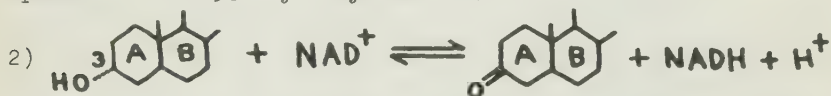
a) Reaktionsprinzip:

Die Bestimmungsmethode beruht auf der Umwandlung von

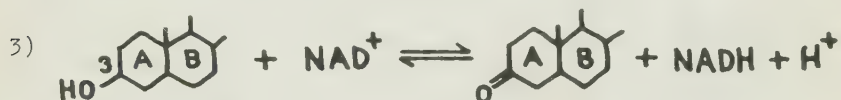
Steroidalkoholen in die entsprechenden Ketone durch die Hydroxysteroiddehydrogenasen nach folgender allgemeiner Gleichung:



Das α -Enzym = 3α -Hydroxysteroiddehydrogenase, oxydiert stereospezifisch ⁽⁶⁾ 3α -Hydroxysteroidoide:



Das β -Enzym = 3β - 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase katalysiert ebenfalls ebenfalls stereospezifisch die Oxydation von 3β - und 17β -Hydroxysteroiden nach folgendem Schema:



Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) dient als Wasserstoff-überträgersubstanz. Die angegebenen Reaktionen können als quantitative Bestimmungsmethode verwendet werden, da NAD^+ und NADH verschiedene optische Dichte im UV-Licht zeigen. NADH zeigt bei $340 \text{ m}\mu$ das Maximum seiner Absorption, NAD^+ absorbiert bei dieser Wellenlänge nicht ⁽⁸⁾ (Optischer Test nach Warburg).

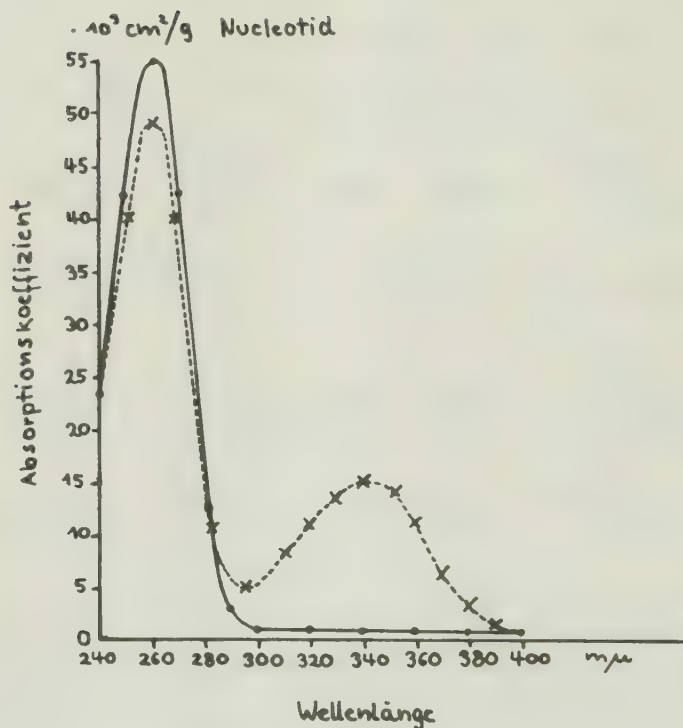


Abb. 1. Diphosphopyridinnukleotid mit Kohlenhydrat hydriert (aus WARBURG O. und CHRISTIAN W. ⁽⁸⁾).

—●— nicht hydriert

×-----× hydriert

Demnach ist die Zunahme der UV-Absorption bei 340 mμ in der Oxydationsreaktion ein genaues Maß für die gebildete Menge NADH. Aus dem molaren Extinktionskoeffizienten, der 6,220 beträgt ⁽⁸⁾, läßt sich die Molarität des während der Reaktion ent. tandenen NADH berechnen. Diese entspricht nach der Reaktionsgleichung stöchiometrisch der oxydierten Menge Steroid-

alkohol.

Im Gegensatz zum Anstieg der optischen Dichte bei der Oxydation von Steroidalkoholen verläuft die Reduktion von Ketosteroiden unter Abnahme der optischen Dichte. Der Abfall der Absorption läßt auf die Menge an verbrauchtem NADH schließen und damit auf die reduzierten Ketosteroide.

Bei jedem chemischen Ablauf, der quantitativ ausgewertet werden soll, muß gefordert werden, daß das Reaktionsgleichgewicht möglichst weit auf eine Seite verschoben wird. Dies wurde in der oxydativen Reaktion durch Erhöhung des pH auf 9,5 erreicht. TALALAY und DOBSON zeigten die eindeutige Begünstigung der Oxydationsreaktion bei steigendem pH (5,6). Dies läßt sich aus der Reaktionsgleichung ohne weiteres ableiten, da H^+ - Ionen als Reaktionsprodukt entstehen und in niedriger Konzentration vorliegen müssen (= alkalisches pH), wenn die Reaktion vollständig ablaufen soll. Die Zufügung von Hydrazinhydrat, das eine ketonbindende Substanz ist, dient ebenfalls der Gleichgewichtseinstellung, denn es verhindert die Rückreaktion durch Entfernen des Reaktionsproduktes.

Die Reduktion der Ketosteroide kann durch Senkung des pH begünstigt werden, was jedoch nur bis pH 5,5 möglich ist. Denn NADH wird zunehmend im sauren Milieu instabil. Man erzielt ähnlich wie in der Oxydationsreaktion die vollständige Gleichgewichtseinstellung durch Beseitigen eines Reaktionsproduktes, hier NAD^+ , durch enzymatische Spaltung mit NADase⁽³⁾.

b) Ausführung der quantitativen Bestimmung:

Die Reaktion läuft in einem Volumen von 3 ml ab, das sich wie folgt zusammensetzt:

1,0 ml Na - Pyrophosphat	0,1 M	pH 9,5
1,0 ml Hydrazinhydrat	1,0 M	pH 9,5
0,8 ml Aqua dest.		
0,1 ml Steroid in Methanol		
0,1 ml NAD^+	0,005 M	

Die Bestandteile wurden in der angegebenen Reihenfolge in ein

Reagenzglas pipettiert, gut gemischt und danach in eine Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke umgegossen. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,05 ml Enzympräparation in Gang gesetzt. Sie läuft bei Zimmertemperatur ab und ist bei der Mehrzahl der reagierenden Steroide in 20 Minuten beendet. Die Zunahme der optischen Dichte wurde im Beckman Spektrophotometer DU bei 340 m in bestimmten Zeitabständen gemessen. Die Messungen wurden gegen den Leerwert (Zusammensetzung wie oben angegeben, jedoch kein Steroid) ausgeführt.

Vor Ablesen eines Wertes wurde jedesmal mit Hilfe der Kontrollküvette der 0 - Punkt korrigiert. Das Endergebnis wurde abgelesen, wenn sich 10 Minuten lang keine Änderung der optischen Dichte mehr ergab.

c) Die Berechnung der umgesetzten Steroidmenge

Die Berechnung geht von der Tatsache aus, daß die maximale Änderung der optischen Dichte der gebildeten Menge an NADH proportional ist, die ihrerseits stöchiometrisch der oxydierten Menge Steroidalkohol entspricht.

$$1 \text{ M Steroidalkohol} \hat{=} 1 \mu\text{M NADH} = \frac{\Delta\text{OD} (340 \text{ m})}{2,07}$$

$$1 \text{ g Steroidalkohol} \hat{=} 1 \mu\text{M Steroid} \cdot \text{MG}$$

ΔOD = maximale Änderung der optischen Dichte

MG = Molekulargewicht des Steroids

Die Zahl 2,07 ergibt sich aus dem molaren Extinktionskoeffizienten von NADH, der 6,220 beträgt. 1 M NADH gibt in 3,0 ml Reaktionsvolumen eine Extinktionsänderung von $\frac{6,220}{3} = 2,07$.

Beispiel für Pregnantriol: (M = 336)

Gemessen wurde $\Delta\text{OD} = 0,062$

$$[\mu\text{M Steroid}] = \frac{0,062}{2,07}$$

$$[\mu\text{g Steroid}] = \frac{0,062 \cdot 336}{2,07} = 10,05 [\mu\text{g}]$$

3. Hemmung der α - Aktivität

Zur Trennung der α - und β -Aktivität diente Parahydroxymercuribenzoat (PHMB). PHMB wurde dem Reaktionsgemisch, wie beschrieben unter 2 b), in einer Konzentration von $6,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ zugefügt, dies entspricht 0,2 ml einer 0,01 M Lösung von PHMB in 0,2 M Trispuffer (pH 9,5) in 3 ml Reaktionsvolumen.

STEMPFEL und SIDBURY zeigten, daß nur Quecksilber und seine Salze von allen Schwermetallen die α - Aktivität isoliert zu hemmen vermögen, ohne die β - Aktivität zu beeinflussen. Das α - Enzym wird bereits durch niedrige Konzentrationen von PHMB ($3,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) gehemmt, die Aktivität des β - Enzyms bleibt bis zu Konzentrationen von $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ vollständig erhalten (3).

IV. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

A. Voruntersuchungen zum Verhalten des Enzyms und zum Reaktionsablauf

1. Enzymstabilität

Die Enzympräparation verlor durch Aufbewahrung bei ungefähr 4°C langsam an Aktivität. Dagegen war sie unter -10°C mehrere Monate haltbar. Nach den Angaben von TALALAY und DOBSON⁽⁵⁾ ließ sich durch das Koenzym NAD^{+} das Enzymgemisch wirkungsvoll stabilisieren. Eine Konzentration von 0,2 M/ml NAD^{+} verhinderte den raschen Abfall der Aktivität, der sich zwangsläufig ergab, wenn die Enzymlösung mehrmals zur Ausführung der Reaktion aufgetaut worden war. So war es möglich bei 0°C kleinere Mengen, z.B. 2 ml, bei den Messungen vollständig zu verwenden, ohne daß ein Verlust der Aktivität zu beobachten gewesen wäre. Die praktische Verwendung des Enzymgemisches gestaltet sich also durch die Enzymstabilisation äußerst sparsam.

Bei der Ausführung der Bestimmungsreaktion ist die Reihenfolge der Zugabe der Reagentien von entscheidender Bedeutung. Wenn sich das Enzym bei Zimmertemperatur in alkalischem pH ohne

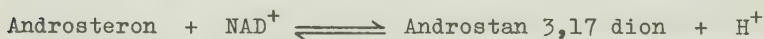
größere Konzentrationen seines Koenzyms in der Küvette befindet, verliert es schnell den größten Teil seiner Aktivität (in 5 Minuten mehr als die Hälfte), und es können größere Steroidmengen nicht mehr quantitativ oxydiert werden. Deshalb ist der Reaktionsablauf durch Zugabe des Enzyms in Gang zu bringen und nicht durch NAD^+ .

2. Enzymaktivität

Bei der Bestimmung der Aktivität ergab sich, daß das Enzymgemisch ungefähr 30 000 E- α -Aktivität (bezogen auf die Eichsubstanz Androsteron) und etwa 2000 E β -Aktivität (Bezogen auf Dehydroepiandrosteron) pro ml besitzt. Als Meßgrundlage diene die von TALALAY und DOBSON ⁽⁵⁾ angegebene Enzymeinheit: Eine Enzymeinheit bewirkt die Änderung der optischen Dichte um $\log_{10} I_0 / I = 0,001$ in 1 Minute bei den oben angegebenen Bedingungen.

3. Einfluß des pH auf das Reaktionsgleichgewicht

Das Reaktionsgleichgewicht zeigte sich für Änderungen des pH empfindlich. Wie aus Gleichung 1), Abschnitt 2a ersichtlich, spielen H^+ -Ionen als Reaktionsprodukt in der Umsetzung eine bedeutende Rolle für die Gleichgewichtseinstellung.



Bei pH 7 wurde nur 30 % des vorhandenen Steroids oxydiert, bei pH 9,5 dagegen reagierten annähernd 100 % des zugefügten Steroids.

B. Bestimmung von Steroiden

1. Bestimmung von Steroiden in Reinsubstanz

a) Bestimmung von 3α -Hydroxysteroiden

Pregnantriol (Pregnan 3α , 17α , 20α -triol):

Es wurden 5, 10, 20, 50 und 100 γ in jeweils 10 Messungen bestimmt. Die gemessenen Extinktionen für die einzelnen Konzentrationen gehen aus Abb. 2) hervor. Die Reaktion lief in kurzer Zeit ab. Bereits nach 2 Minuten war der Anstieg der Absorption beendet; sie blieb für lange Zeit konstant auf dem selben Wert. Die Richtigkeit der Messungen betrug 99%, die Standardabweichung 2,56 %.

Androsteron (3 α - Hydroxy - 5 α - Androstan - 17 - on):

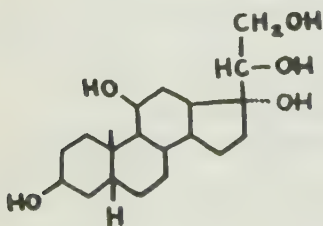
In jeweils 5 Messungen von 5, 10, 20 und 50 γ wurden 99,5 % $\pm$ 1,8 % des Steroids wiederentdeckt. Die gemessenen Extinktionen für die jeweiligen Konzentrationen gehen aus Abb. 3) hervor. Die Reaktion war ähnlich wie beim Pregnantriol in sehr kurzer Zeit beendet.

Tetrahydrocortison THE (3 α , 17 α , 21 - Trihydroxy - 5 β - pregnan - 11,20 dion) :

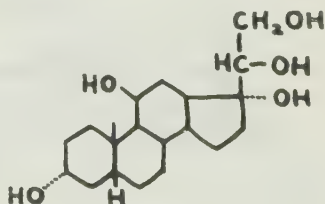
Bei je 8 Bestimmungen von 5, 10 und 20 γ betrug die Richtigkeit der Messungen 98 % mit einer Abweichung von $\pm$ 1,3 % (siehe Abb. 4). THE wurde gegenüber den vorher beschriebenen Steroiden wesentlich langsamer oxydiert.

Cortol (5 β - Pregnan - 3 α - 11 β - 17 α - 20 α - 21 -Pentol) und β - Cortol (5 β - Pregnan 3 α - 11 β - 17 α - 20 α - 21-Pentol):

5 Bestimmungen von 5, 10, 20, 50 und 100 γ unter den gleichen Bedingungen wie bei den vorher besprochenen Steroiden ergaben keinen Anstieg der Absorption, trotz vorhandener 3 α Gruppierung. Auch nach 30 Minuten war keine Zunahme zu beobachten.



β - Cortol



Cortol

Pregnandiol (5β - Pregnan - 3α , 20α - diol):

Auch hier wurden 5, 10, 20, 50 und 100 in üblicher Weise bestimmt. Die Methode versagte hier ebenfalls, da das Hormon im Reaktionsmedium eine Trübung verursachte bis zur Opaleszenz. Bereits kleine Mengen Pregnandiol bewirkten eine deutliche Verschleierung der Lösung.

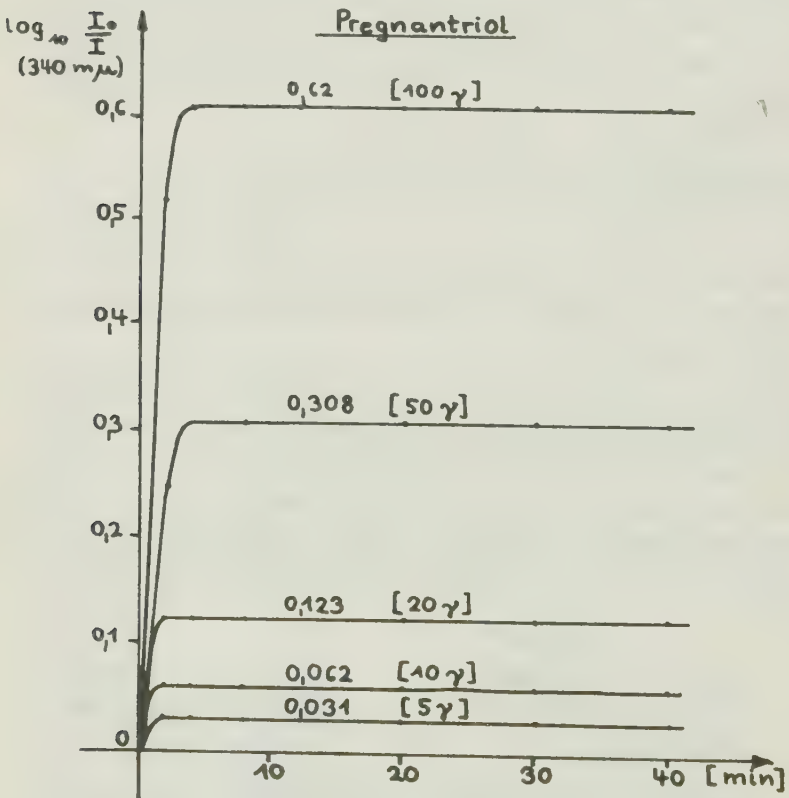


Abb. 2 Zeitlicher Ablauf der Oxydation von Pregnantriol: Anstieg und Endwert der gemessenen Extinktionen bei Bestimmung von 5, 10, 20, 50, 100 γ Pregnantriol.

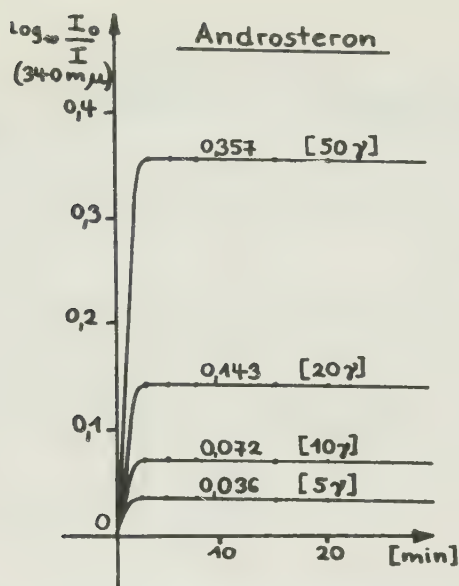


Abb. 3. Anstieg und Endwert der Extinktionen bei der enzymatischen Bestimmung von 5, 10, 20, 50 γ Androsteron.

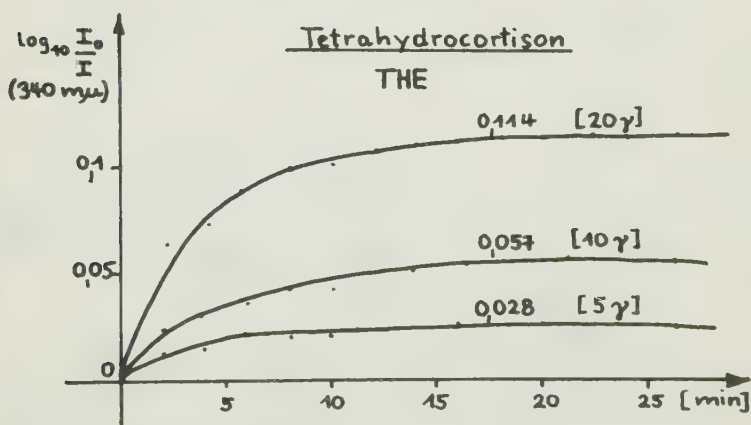


Abb. 4. Anstieg und Endwert der Extinktionen bei der Bestimmung von 5, 10 und 20 γ Tetrahydrocortison

b) Bestimmung von 3β - und 17β -Hydroxysteroiden

Dehydroepiandrosteron DEA (3β -Hydroxyandrost-5-en-17-on):

In jeweils 10 Messungen von 5, 10, 20 und 50γ betrug die Richtigkeit der Ergebnisse 100 %, die Standardabweichung $\pm 1,2$ %. Der Anstieg der Absorption war nach etwa 16 Minuten beendet. Die Extinktionen und der zeitliche Ablauf gehen aus Abb. 5) hervor.

Aetiocholanolon (17β -Hydroxy-5 β -androstan-3-one):

Jeweils 10 Messungen von 5, 10, 20, 50, 100γ ergaben eine Richtigkeit der Ergebnisse von 99,1 % mit einer Abweichung von $\pm 2,1$ %. Bei diesem Hormon wurden die längsten Reaktionszeiten beobachtet. Erst nach 50 Minuten war das Gleichgewicht eingetreten (Abb. 6)).

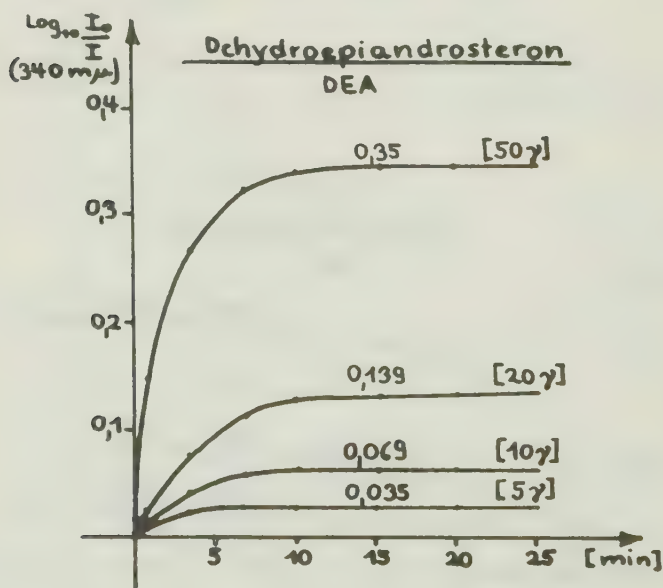


Abb. 5. Anstieg und Endwert der Extinktionen bei der enzymatischen Bestimmung von 5, 10, 20, 50γ Dehydroepiandrosteron

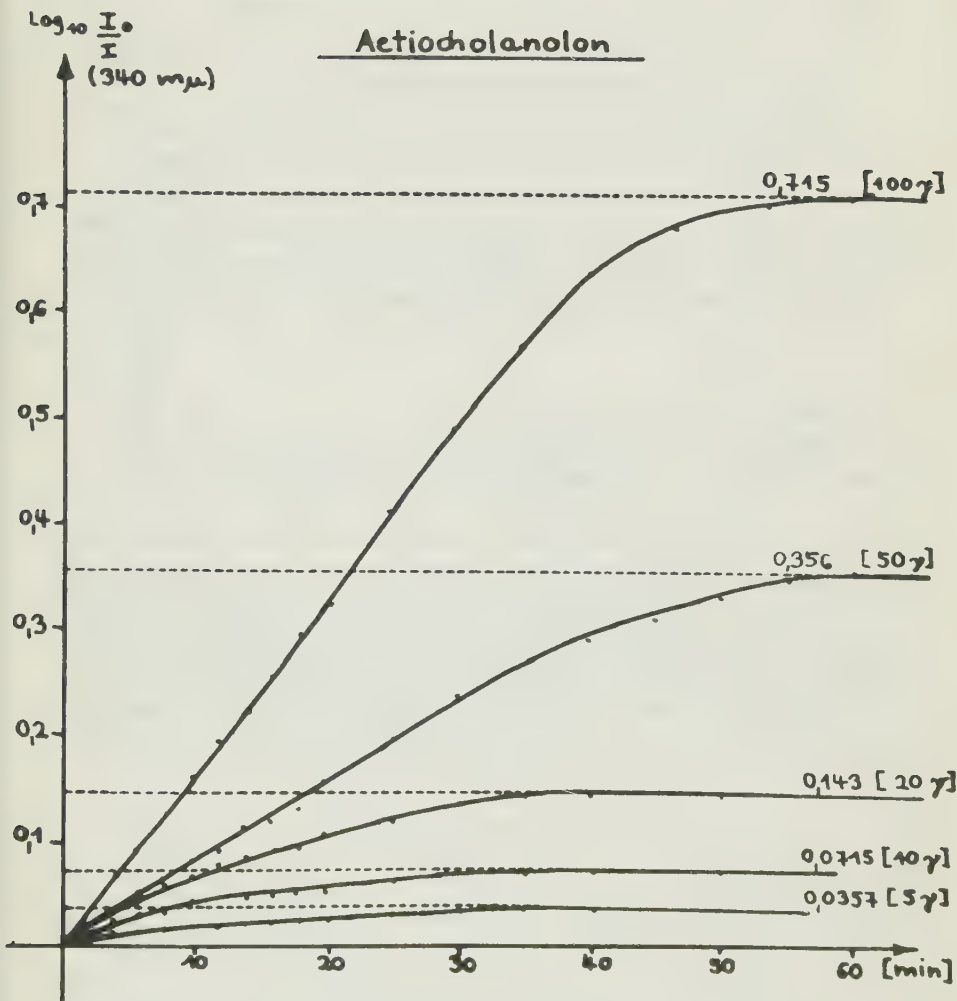


Abb. 6. Anstieg und Endwert der Extinktionen bei der Bestimmung von 5, 10, 20, 50, 100γ Actiocholanolon

Aus der Bestimmung der Steroide, die als Reinsubstanzen vorlagen, konnten folgende Ergebnisse gewonnen werden:

1. Die Richtigkeit der Messungen betrug 99,2 % mit einer Standardabweichung von $\pm 1,79$ %.
2. Die Abhängigkeit von Steroidkonzentration und Zunahme der optischen Dichte ist linear bei Steroidmengen bis 100 γ (siehe Abb. 7). Kleinere Mengen als 5 γ können in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke nicht mehr exakt bestimmt werden, da die Schwankungsbreite, bedingt durch die Apparatur und Ungenauigkeiten in der Ausführung, bei diesen kleinen Absorptionsänderungen relativ groß ist.

2. Hemmung der α - Aktivität (Siehe Abb. 7)

Die Hemmung der α - Aktivität wurde 5 mal durchgeführt.

Zunächst wurden die Extinktionen von 10 γ Pregnantriol (3 α - Steroid) und 10 γ Dehydroepiandrosteron DEA (3 β - Steroid) in jeweils 10 Messungen bestimmt, danach ebenfalls 10 mal die Bestimmung eines Gemisches von 10 γ Pregnantriol und 10 γ DEA. Das Hormongemisch ergab ohne Zusatz von PHMB die Summe der Absorptionen der beiden Einzelhormone. Bei Zusatz von PHMB zum Reaktionsmedium (siehe Abschnitt II, 3) stieg die Absorption auf den gleichen Wert wie ihn DEA allein ergab, d.h. Pregnantriol beteiligte sich nicht an der Reaktion.

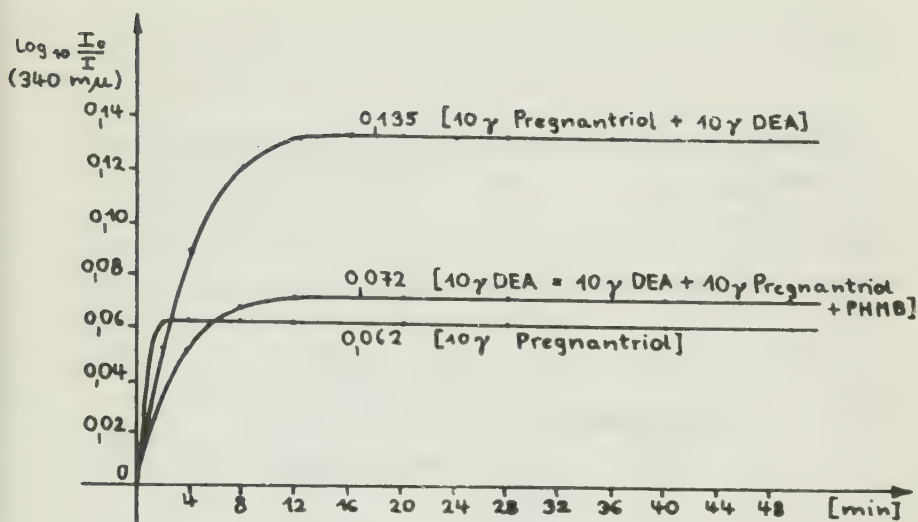


Abb. 7. Hemmung der α -Aktivität mit PHMB: Es sind die Einzel-extinktionen für Pregnantriol und DEA dargestellt sowie die Extinktion für das Gemisch aus Pregnantriol und DEA. Die Extinktion des Gemisches nach Hemmung der α -Aktivität entspricht der Extinktion von DEA allein.

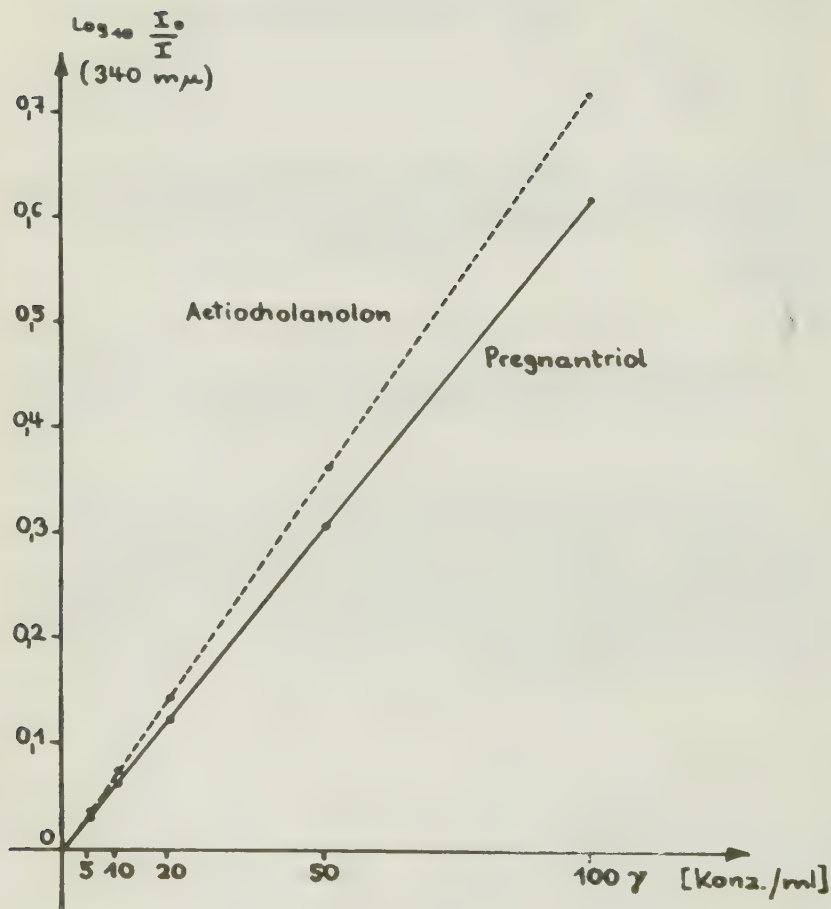


Abb. 8. Lineare Abhängigkeit zwischen Extinktionen und Steroidkonzentrationen dargestellt für Aetiocholanolon und Pregnantriol in Konzentrationen von 5, 10, 20, 50, 100 γ

Folgende Untersuchungen sollen Anhaltspunkte geben, inwieweit die enzymatische Bestimmung von Steroiden in Extrakten aus biologischem Material (Urin) möglich ist.

3. Die Messung des Gehaltes an 3α - und 3β -Hydroxysteroiden im Neutralextrakt aus Urin.

Neutralextrakte aus Urin (hergestellt nach der Methode von ZIMMERMANN ⁽²⁵⁾ wie bei der Bestimmung von 17 - Ketosteroiden) wurden eingedampft und zur quantitativen Messung des Steroidgehaltes mit HSDH in Methanol gelöst.

Bei 6 gesunden Versuchspersonen ergaben sich folgende Werte für die tägliche Steroidausscheidung:

3 Frauen:	8,9	M	$\hat{=}$	2,6 mg / Tag
	10,7	M	$\hat{=}$	2,7 mg / Tag
	9,3	M	$\hat{=}$	3,1 mg / Tag
3 Männer:	26,2	M	$\hat{=}$	7,6 mg / Tag
	12,4	M	$\hat{=}$	3,6 mg / Tag
	14,8	M	$\hat{=}$	4,3 mg / Tag

Die Werte der Frauen lagen also im Mittel bei 2,8 mg / Tag, bei Männern bei 5,2 mg / Tag. Sie sind in der gleichen Größenordnung wie die Ergebnisse von TALALAY, DOBSON und HÜBENER ^(5,12).

Diese Autoren fanden 3 mg bei Frauen und 6 mg bei Männern. Die hier gewonnenen Werte der 3α - und 3β - Hydroxysteroiden im Neutralextrakt stehen in einem direkten Verhältnis zu den Werten der 17 - Ketosteroiden, da 70 % dieser Hormongruppe eine 3 - Hydroxylgruppe tragen ⁽⁹⁾ und somit enzymatisch erfaßt werden können.

Ein Vergleich der Werte der enzymatischen Methode mit den Ergebnissen der colorimetrischen nach ZIMMERMANN ergab bei einer Patientin mit Cushing-Syndrom und ausgeprägter Virilisierung durch Nebennierenrindenkarzinom 4,15 mg Steroid (143 μ M) mit der enzymatischen und 53 mg mit der colorimetrischen Reaktion.

4. Bestimmung von Pregnantriol aus dem Urin

Zur Bestimmung von Pregnantriol aus dem Urin wurden 3 Extrakte

(hergestellt nach der Methode von COX und FINKELSTEIN ⁽²¹⁾)
eingedampft und danach in Methanol gelöst.

Es wurde eine tägliche Pregnantriolausscheidung von 1,2 mg, 2,0 mg und 2,1 mg gefunden. COX gab als Normalwert für seine Methode ⁽²³⁾ 0,1 bis 2 mg an.

5. Bestimmung von chromatographisch getrennten Steroiden aus dem Urin

Um Anhaltspunkte zu gewinnen, inwieweit sich von Chromatographiepapier eluierte Steroide auf enzymatische Weise bestimmen lassen, wurde der Hormongehalt von einem Chromatogramm sowohl colorimetrisch als auch enzymatisch bestimmt.

Aus dem Chromatogramm wurden die Fraktionen THE, THF, AlloTHF und THB eluiert (Urinextraktion, Chromatographie und Eluation erfolgten nach den Angaben von H.J. KARL und L. RAITH ⁽²⁴⁾) und fermentativ sowie colorimetrisch mit Blautetrazol ⁽²⁴⁾ bestimmt.

	colorimetrisch	fermentativ
THE	1,74 mg	1,64 mg
THF	1,45 mg	1,57 mg
AlloTHF		0,63 mg
THB	1,41 mg	1,49 mg

V DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE

1. Zur Enzymstabilität

Der Verlust der Enzymaktivität der bei Aufbewahrung um 4°C beobachtet wurde, wäre für das praktische Arbeiten mit dem Enzymgemisch sehr nachteilig. Es würde in kurzer Zeit unbrauchbar werden. Die Möglichkeit, das Enzymgemisch mit NAD⁺ zu stabilisieren, stellt also einen entscheidenden Vorteil dar und gestaltet das Arbeiten einfach und sparsam. Es muß nur darauf geachtet werden, daß sich das Enzym nie über den 0 - Punkt er-

wärmt (zur Ausführung der Reaktion stets in Behälter mit Eisstückchen stellen).

2. Vergleich der Eigenschaften des Enzymgemisches mit den isolierten α - und β - Enzymen.

MARCUS und TALALAY ^(1,5) gaben für die Darstellung der isolierten α - und β -HSDH eine langwierige und komplizierte Methode an, die mehrmaliges Ausfällen mit Aceton und Ammoniumsulfat, sowie Kalziumphosphatgelabsorption erfordert. Damit kann eine weitgehende, aber keineswegs vollständige Trennung von α - und β -Aktivität erzielt werden. DELIN und PORATH ⁽⁷⁾ entwickelten ein einfacheres Verfahren mit Sephadex - Gel - Filtration, das α - und β - Enzym sehr weitgehend zu trennen vermag. Vergleicht man damit die einfache Darstellung des Enzymgemisches, so taucht die Frage auf, welche Vorteile der isolierten Enzyme den großen Arbeitsaufwand rechtfertigen, bzw. für welche Anwendungsgebiete das leicht herstellbare Enzymgemisch genügt. Zur quantitativen Bestimmung von bekannten, reinen Steroiden ist das Enzymgemisch sehr gut geeignet. Nicht nur einzelne reine Steroide, sondern auch Gemische können exakt bestimmt werden, da sich die beiden Enzyme im Gemisch gegenseitig nicht in ihrer Aktivität beeinflussen ⁽⁴⁾. Mit dem unveränderten Enzymgemisch kann jedoch nur die Summe der reagierenden Steroide bestimmt werden. Sind z.B. im Lösungsgemisch Steroide mit 3 α -, 3 β - und 17 β - Gruppen, so wird die Gesamtheit aller reaktionsfähigen Gruppen gemessen, eine Trennung nach α - und β - Aktivitäten wäre auf diese Weise also nicht möglich. Mit den gereinigten Enzymen jedoch, könnten α - und β - Gruppen getrennt quantitativ bestimmt werden. Auch für die Identifikation von unbekannten Steroiden auf Grund ihrer sterischen Unterschiede sind die Einzelenzyme von großem Wert.

Um diese Einschränkung im Anwendungsbereich des Enzymgemisches auszugleichen, müßte eines der beiden Enzyme gehemmt werden. Dies gelang MARCUS und TALALAY ⁽⁶⁾ durch Quecksilber, Kupfer und Parahydroxymercuribenzoat (PHMB) welche das α -Enzym

vollständig hemmen. TALALAY und DOBSON ⁽⁵⁾ zeigten, daß PHMB keine Einwirkung auf das β -Enzym ausübt, wenn dessen Koenzym vorhanden ist. Der Konzentrationsbereich, in dem PHMB das α -Enzym hemmt, ohne gleichzeitig das β -Enzym zu beeinflussen, ist sehr groß. Er beträgt nach den Angaben von STEMPFEL und SIDBURY bis zum 8-fachen der minimalen Hemmkonzentration. Durch die Hemmung der α -Aktivität ist es also auch mit dem Enzymgemisch möglich, α - und β -Gruppen getrennt zu bestimmen. Die rein dargestellten Enzyme haben ferner den Vorteil, daß ihre Aktivität / ml sehr hoch ist. Das hier dargestellte Enzymgemisch hat nur etwa 1/3 bis 1/4 der Aktivität, die TALALAY, DOBSON und MARCUS ^(1,5) erzielen konnten. Wie die Versuche zeigten, ist jedoch die Aktivität des Enzymgemisches völlig ausreichend.

3. Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Steroide

Der Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten zeigte, daß die geprüften Steroide mit 3α -gruppiertem Hydroxylgruppe auffallend rasch den Endwert der Absorption erreichen. Steroide mit 3β - und 17β -gruppierten Hydroxylgruppen dagegen reagieren um ein Vielfaches langsamer. Dies läßt sich einfach erklären, da das Enzymgemisch relativ viel α -Aktivität, jedoch wenig β -Aktivität enthält. Ein weiterer Faktor, der die Reaktionsgeschwindigkeiten auch innerhalb der α - bzw. β -Hydroxysteroiden erklärt, ist die unterschiedliche Affinität der Enzyme zu den einzelnen Steroiden. DEA hat z.B. eine höhere Affinität zum Enzym als Aetiocholanolon, ebenso hat Androsteron eine höhere gegenüber Pregnantriol ⁽²⁾.

4. Versagen der Methode

Daß Steroide trotz vorhandener 3α -Gruppierung nicht reagieren, wie es hier bei Cortol und β -Cortol der Fall war, berichten auch TALALAY und DOBSON ⁽⁵⁾. Diese Autoren teilen eine entsprechende Beobachtung mit bei 17α -Östradiol, das keine Reaktion zeigte, und bei 17β -Östradiol wird nur die 17β -

Gruppe, nicht aber die 3α -Gruppe oxydiert. Da in Kontrollversuchen ein Fehler in der Ausführung oder im Versuchssystem ausgeschlossen werden konnte, ist das Ausbleiben der enzymatischen Reaktion als spezielle Eigenschaft von Cortol und β -Cortol anzusehen.

Es war auch nicht möglich, Pregnandiol zu bestimmen. In der Meßküvette war nach Zugabe des Hormons eine Trübung festzustellen, sodaß die Messung unmöglich wurde. STEMPFEL und SIDBURY (4) machten die gleiche Beobachtung.

5. Die Richtigkeit der Messungen bei der Steroidbestimmung

Die hier ermittelte Genauigkeit der enzymatischen Bestimmung von Hydroxysteroiden in Reinsubstanz stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren weitgehend überein (4,9,10). Für die Bestimmung von Reinsubstanzen geben STEMPFEL und SIDBURY z.B. $100 \pm 1,2\%$ an, was den hier gewonnenen Werten von $99,2 \pm 1,79\%$ entspricht. Die Ergebnisse der enzymatischen Bestimmung zeigen eine geringe Schwankungsbreite, wie sie den enzymatischen Methoden allgemein eigen ist.

Bei der Messung von Steroiden aus dem Urin spielen im Gegensatz zu den chemischen Bestimmungsmethoden unspezifische Reaktionen, die das Meßergebnis beeinflussen, keine Rolle. Denn die beiden Enzyme reagieren stereo- und substratspezifisch.

6. Zur praktischen Anwendbarkeit

Durch die einfache Enzymdarstellung kann die Methode ohne Schwierigkeiten für praktisch wichtige und routinemäßig ausgeführte Bestimmungen von Steroiden verwendet werden. Dabei ist ein großer Vorteil, daß das Enzym relativ unempfindlich und sehr lange haltbar ist, wenn es unter geeigneten Bedingungen aufbewahrt wird. Die Ausführung der Reaktion selbst geht rasch und einfach vor sich, die Genauigkeit der Ergebnisse ist zufriedenstellend. Allerdings können mit 1 cm weiten Küvetten nur Steroidmengen über $5\gamma/\text{ml}$ exakt bestimmt werden.

VI ZUSAMMENFASSUNG

In der Einleitung wurde eine kurze Übersicht über bisher bekannte Enzyme gegeben, die bei der Oxydation von Steroidhormonen mitwirken. Solche Enzyme sind aus Organen von Säugetieren und aus Mikroorganismen isoliert worden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei spezifische Enzyme, α - und β -Hydroxysteroiddehydrogenase (HSDH), aus dem Bodenbakterium *Pseudomonas testosteroni* zur quantitativen enzymatischen Bestimmung von 3α -, 3β - und 17β -Hydroxysteroiden verwendet. Die Darstellung der Enzyme, die als Gemisch gewonnen wurden, erfolgte durch Fällung mit Aceton und anschließendes Zentrifugieren in der Kälte zur Abtrennung der korpuskulären Bestandteile nach den Angaben von STEMPFEL und SIDBURY.

Die quantitative Bestimmung von 3α -, 3β - und 17β -Hydroxysteroiden durch enzymatische Oxydation mit NAD^+ als Koenzym wurde ebenfalls nach den Angaben von STEMPFEL und SIDBURY ausgeführt.

Zunächst wurden Voruntersuchungen über das Verhalten des Enzymgemisches und über den Ablauf der Bestimmungsreaktion durchgeführt. Es ergab sich, daß das Enzymgemisch bei 4°C in wenigen Wochen den größten Teil seiner Aktivität verlor, dagegen bei Temperaturen unter -10°C über längere Zeit (ungefähr 6 Monate) beständig war. Nach Stabilisierung durch das Koenzym NAD^+ war es auch bei Temperaturen bis zum Nullpunkt mindestens 1. Monat haltbar.

Die Aktivität des Enzymgemisches betrug für das α -Enzym ungefähr 300000 E / ml und war somit relativ hoch, für das β -Enzym wurde dagegen nur eine Aktivität von 2000 E / ml gemessen. Das pH Optimum für das Reaktionsgleichgewicht lag bei pH 9,5.

Folgende Hydroxysteroiden in Reinsubstanz wurden quantitativ in der Größenordnung von 5 bis 100 γ / ml enzymatisch bestimmt:

- 1.) aus der Gruppe der 3α -Hydroxysteroiden: Pregnantriol, Androsteron, Tetrahydrocortison, Cortol, β -Cortol, Pregnandiol,
- 2.) aus der Gruppe der 3β -Hydroxysteroiden: Dehydroepiandrosteron und Aetiocholanolon.

Cortol und β -Cortol konnten mit der angegebenen Methode nicht bestimmt werden, da diese beiden Steroide keine Reaktion eingingen: Bei Pregnantriol trat in der Meßküvette eine Trübung auf, was die optische Messung verhinderte.

Bei den Bestimmungen von Steroiden in Reinsubstanz zeigten die Untersuchungen folgende Ergebnisse: Die Richtigkeit aller Messungen betrug $99,2 \pm 1,79 \%$. Die Abhängigkeit von Steroidkonzentration und Zunahme der optischen Dichte war bei Steroidmengen von 5 bis 100 γ /ml linear.

Die Verwendung von α - und β -HSDH als Gemisch brachte den Nachteil, daß die beiden Enzymaktivitäten nicht getrennt gemessen werden konnten. Es wurde deshalb die Möglichkeit geprüft, das α -Enzym durch Parahydroxymercuribenzoat (PHMB) isoliert zu hemmen. Es ergab sich, daß bei Bestimmung eines Gemisches von Pregnantriol und Dehydroepiandrosteron (DEA) nach Hemmung des α -Enzyms nur noch DEA allein eine Reaktion einging. Auf diese Weise war es möglich, α - und β -Hydroxylgruppen tragende Steroide im Gemisch auch einzeln zu bestimmen.

Um Anhaltspunkte zu gewinnen, ob die Methode zur Bestimmung von Steroiden aus biologischem Material brauchbar ist, wurden 3α - und 3β -Hydroxysteroiden aus 6 Urinextrakten nach ZIMMERMANN, sowie Pregnantriol aus 3 Extrakten nach COX und FINKELSTEIN enzymatisch gemessen. Auch von einem Chromatogramm eluierte Steroide (THE, THF, Allo THF und THB) wurden bestimmt; es ergab sich eine weitgehende Übereinstimmung dieser Werte mit denen anderer Methoden, die zum Vergleich zur enzymatischen Bestimmung durchgeführt wurden.

Die enzymatische Bestimmung von 3α -, 3β - und 17β -Hydroxysteroiden stellt eine einfache, zuverlässige und spezifische Methode dar.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- 1) P.J. MARCUS und P. TALALAY, J. Biol. Chem. 218,661, 1956
Induction and Purification of α - and β - Hydroxysteroid
Dehydrogenases
- 2) P.J. MARCUS und P. TALALAY, J. Biol. Chem. 218, 675, 1956
Specificity, Kinetics, and Inhibition of α - and β - Hydroxy-
steroid Dehydrogenases
- 3) B. HURLOCK und P. TALALAY, Proc.soc.Exper.Biol.Med. 93,560,
1956. Enzymatic Estimation of Urinary Steroids
- 4) R.S. STEMPFEL und J.R. SIDBURY, J.of Clin.Endocrin. 24,367,
1964. Studies with the Hydroxysteroid Dehydrogenases: I. A
Simplified Method for the Enzymatic Estimation of 3α and
 17β - Hydroxysteroids
- 5) P. TALALAY und M.M. DOBSON, J. Biol.Chem. 205, 823, 1953
Purification and Properties of a β - Hydroxysteroid Dehydro-
genase
- 6) P. TALALAY und P.J. MARCUS, Nature, 173, 1189, 1954
Enzymatic Formation of 3α - Hydroxysteroids
- 7) S. DELIN und J. PORATH, Biochim.Biophys.Acta, 67,197,1963
Purification of α - and β - Hydroxysteroiddehydrogenases from
Pseudomonas testosteroni by Gel Filtration
- 8) O. WARBURG und W. CHRISTIAN, Biochem. Z. 287, 291, 1936
Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von
Gärungsfermenten. (Pyridin.- Nucleotide.)
- 9) B. HURLOCK und P. TALALAY, Endocrin. 62, 201, 1958
Enzymatic Estimation of Steroids in Human Urine
- 10) E.M. GLENN und D.H. NELSON J.Clin.Endocrin. 13, 911, 1953
Chemical Method for Determination of 17 - Hydroxycortico-
steroids and 17 - Ketosteroids in Urine following Hydrolysis
with β - Glucuronidase
- 11) H.J. HÜBENER, H.V. BERGMAYER, Methoden der Enzymatischen
Analyse, 1962, S. 485, Steroidalkohole im Harn
- 12) H.J. HÜBENER und W.H. STAIB, Biochemie und Klinik: Bioche-
mie der NNR-Hormone, 1956, S. 212

- 13) J. ZANDER und H.D. HENNIG, Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie, 330, 31, 1962/63. Verwendung von Hübener's 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase bei mikroskopischer Identifizierung und Trennung von Steroiden
- 14) B. HURLOCK und P. TALALAY, J. Biol.Chem. 227,37, 1957 Principles of the Measurement of Steroids
- 15) Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Band XIV, Teil I, The Adrenocortical Hormones, Subeditor H. WENDLER-DEANE, 1962
- 16) L. MAMOLI und J. VERCELLONI, Ber. Chem.Ges. 71,1686, 1938 Über die biochemische Dehydrierung in der Reihe der Keimdrüsenhormone: Bakterielle Oxydation von Dehydroandrosteron zu Androstendion
- 17) C. HEUSGHEM und M. WELSCH, Bull.Soc.chim.biol. 31,282,1949 Transformation de l'oestradiol en oestrone par un Streptomyces
- 18) P. TALALAY, Methods in Biochemical Analysis, Band VIII. Interscience, 119, 1961 Enzymatic Analysis of Steroid Hormones
- 19) P. TALALAY, M.M. DOBSON und D.F. TAPLAY, Nature, 170,620,1952 Oxydative Degradation of Testosterone by Adaptive Enzymes
- 20) H.J. HÜBENER und C.O. LEHMANN, Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie, 313,124, 1958. Die enzymatische 20-Keto-Reduktion durch Extrakte aus Streptomyces hydrogenans
- 21) R.I. COX und W.M. FINKELSTEIN, J.of Clin.Invest.36,1726,1957 Pregnane-3 α , 17 α , 20 α -triol and Pregnane 3 α , 17 α , 20 α -triol-11-one Excretion by Patients with Adrenocortical Dysfunction.
- 22) H.L. MASON und W.W. ENGSTRÖM, Phys.Revs. 30,321, 1950 The 17-Ketosteroids: Their Origin, Determination, and Significance
- 23) R.I. COX, Acta Endocrinologica, 33, 477, 1960 Pregnane-3 α , 17 α , 20 α Triol, Pregnane-3 α , 17 α , 20 α -Triol-11-one and Related Steroids
- 24) H.J. KARL und L. RAITH, Klin.Wochenschrift, 43,863, 1965 Die Corticosteronsekretion beim Menschen. I.Mitteilung: Methode zur Bestimmung der Sekretionsrate. Werte von Normalpersonen

- 25) W. ZIMMERMANN, Hoppe - Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie, 245, 47, 1936, Colorimetrische Bestimmung der Keimdrüsenhormone

L E B E N S L A U F

Als Tochter des damaligen Städtischen Amtsarztes Dr. Wilhelm E n z l e r und seiner Ehefrau Klara bin ich am 9. Mai 1941 in Augsburg geboren. Kindheit und Schulzeit verbrachte ich in Stadtbergen bei Augsburg. 1951 trat ich in die Städt. Maria-Theresia-Oberrealschule in Augsburg über, wo ich 1960 mit der Reifeprüfung abschloß. Im Herbst 1960 begann ich das Studium der Medizin in München und legte 1963 das Physikum dort ab. Auch mein klinisches Studium absolvierte ich in München und schloß 1966 in München mit dem Staatsexamen ab.

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 1965 und 1966 unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. H. J. Karl in der I. Medizinischen Klinik der Universität München.

